

На правах рукописи

Деденева Светлана Сергеевна

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЧЕВИНЫ И
КРЕАТИНИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Казань – 2010

Работа выполнена на кафедре физики и химии ГОУ ВПО "Уральский
государственный экономический университет"

Научные руководители: заслуженный деятель науки РФ,
доктор химических наук, профессор
Брайнина Хьена Залмановна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Евтюгин Геннадий Артурович

кандидат химических наук, доцент
Великанова Татьяна Валентиновна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт органической и физической химии
(ИОФХ) им. А.Е. Арбузова Казанского
научного центра РАН

Защита состоится 20 мая 2010 года в 14.30 на заседании Диссертационного
совета Д 212.081.03 по химическим наукам при Казанском государственном
университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань,
ул.Кремлевская 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, КГУ, Бутлеровская
аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.
Лобачевского Казанского государственного университета. С авторефератом можно
ознакомиться на сайте КГУ (www.ksu.ru).

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская 18,
Казанский государственный университет, Научная часть, или по электронной почте
mkazymov@ksu.ru

Автореферат диссертации разослан «____» апреля 2010 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент



М.А. Казымова.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Решения, связанные с охраной здоровья населения и ранней диагностикой заболеваний требуют развития новых и эффективных методов определения компонентов биологических жидкостей — маркеров функционирования органов и систем человеческого организма.

При ряде заболеваний, сопровождающихся нарушением работы почек, может возникнуть острая почечная недостаточность, ранняя диагностика которой способствует своевременному оказанию медицинской помощи и уменьшает риск развития хронической или тяжелой форм заболевания. Общеизвестными диагностическими показателями функциональной способности почек являются содержание креатинина и мочевины в сыворотке крови и в моче, так как именно в почках происходит выделение азотистых компонентов крови.

В современной лабораторной диагностике для мониторинга заболеваний почек используются фотометрические приборные методы, в которых в качестве распознающего элемента чаще всего применяются ферменты.

Для определения мочевины используют прямые фотометрические методы, основанные на реакции мочевины с диацетилмонооксидом или каталитической реакции с уреазой. Фотометрическое определение креатинина, как правило, основано на реакции Яффе или, крайне редко, на реакции ферментативного гидролиза под действием иминогидролазы креатинина с использованием автоанализаторов. Чувствительность используемых методов зависит от устойчивости окраски анализируемых комплексов, собственной окраски исследуемого образца, устойчивости ферментов при хранении и эксплуатации, действия высоких и низких температур, бактериальных загрязнений и т.д. Как следствие, сложность методики анализа, а также высокая стоимость оборудования и расходных материалов исключают повсеместное проведение лабораторной диагностики почечной недостаточности, в частности в небольших клиниках.

Для решения проблемы требуется создание новых экспрессных, чувствительных и селективных методов и сенсоров для диагностики почечной недостаточности, исключающих применение ферментов.

Высокая чувствительность и селективность, оперативность получения результата, возможность работы в полевых условиях, относительная простота и доступность аппаратного оформления позволяют предложить для определения мочевины и креатинина электрохимические методы анализа.

Настоящая диссертационная работа посвящена развитию новых подходов к созданию бесферментных амперометрических сенсоров для определения мочевины и креатинина с использованием в качестве чувствительного элемента наночастиц NiO или макроциклических комплексов никеля (II). Селективность определения обеспечивается применением либо анионообменной колонки (в случае мочевины), либо полимеров с молекулярными отпечатками (в случае креатинина). Разработанный сенсор не уступает по чувствительности и селективности ферментсодержащим биосенсорам и лишен недостатков последних.

* Научным консультантом является кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии ГОУ ВПО «УГТУ-УПИ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» **Козицина Алиса Николаевна**

Актуальность представленной работы определяется как изложенными выше соображениями, так и ожидаемым упрощением и удешевлением методики и аппаратного обеспечения в диагностике почечной дисфункции.

Работа является частью исследований, проводимых на кафедре химии и физики и кафедре химии Уральского государственного экономического университета при поддержке грантов РФФИ-офи «Молекулярный дизайн металлсодержащих рецепторов биогенных аминов на основе макрогетероциклических систем, модифицированных азагетероциклами и создание на их основе бесферментных сенсоров» (2006-2007 гг.), РФФИ-Урал «Электродные процессы в системах: электрод-металлсодержащий рецептор биогенных аминов – определяемый амин» (2007-2009 гг.), а также в рамках заданий Министерства промышленности и науки Свердловской области «Нанотехнологии в био- и химических сенсорах для мониторинга окружающей среды и здоровья человека» (2008-2010 гг.)

Цель работы. Разработка бесферментных амперометрических сенсоров для прямого и селективного определения мочевины и креатинина на основе наночастиц NiO и хелатных комплексов никеля (II) как каталитических систем электрохимического окисления указанных аналитов, а также полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) креатинина, определяющих селективность определения.

Для достижения указанной цели необходимо решить следующие задачи:

— выбрать оптимальный метод синтеза наночастиц NiO и исследовать влияние размера и способа иммобилизации полученных наночастиц на поверхности толстопленочного углеродсодержащего электрода на каталитическую активность электрохимического окисления мочевины и/или креатинина;

— выбрать материал толстопленочного электрода и способ иммобилизации каталитической системы на основе органических комплексов никеля (II) на рабочую поверхность толстопленочного электрода;

— изучить каталитические системы на основе органических комплексов никеля (II), способных генерировать воспроизводимый аналитический отклик в присутствии определяемого аналита;

— исследовать кинетику электрохимического каталитического окисления мочевины и креатинина в присутствии каталитической системы;

— охарактеризовать рабочие условия регистрации аналитического сигнала в присутствии определяемого аналита;

— исследовать способность полимеров с молекулярными отпечатками креатинина к селективной сорбции молекул креатинина из модельных растворов

— разработать новые сенсоры для хроноамперометрического определения мочевины и креатинина с высокими аналитическими и метрологическими характеристиками.

Научная новизна.

— Методом обратных микроэмульсий синтезированы наночастицы NiO сферической формы, средний диаметр которых составляет порядка 20 нм. Наиболее выраженная электрокаталитическая активность в электрохимическом окислении мочевины наблюдается при использовании образца наночастиц NiO, синтезированных при 45°C с использованием цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) в качестве ПАВ.

— Установлен рост каталитической активности наночастиц NiO в электрохимическом окислении мочевины при увеличении содержания наночастиц в модифицирующей суспензии до 0,5 г/л (в пересчете на содержание Ni(II)). Выше этого значения наблюдается снижение каталитической активности из-за ускорения процессов

агломерации наночастиц и фазовых изменений. Получена линейная зависимость тока, регистрируемого при заданном потенциале, от концентрации мочевины в диапазоне концентраций аналита от $1 \cdot 10^{-3}$ М до $8 \cdot 10^{-3}$ М при использовании толсто пленочных электродов, модифицированных наночастицами NiO;

— в качестве каталитических систем в электрохимическом окислении мочевины и креатинина использованы органические комплексы никеля (II), способные к дополнительной координации с молекулами аналита, что позволило увеличить чувствительность определения указанных аналитов. Из 16-ти исследованных органических комплексных соединений никеля (II) лучшие аналитические характеристики при электрохимическом определении мочевины и креатинина были получены для пяти органических комплексов Ni (II): 1,1,1,7,7,7-гексафторгептан-2,4,6-трикетоната диникеля (II) тетрагидрата (II); 4,4,5,5,6,6,7,7,7-нонафтор-1-фенилгептан-1,3-дикетоната никеля (II) (III); [(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-(бензотиазол-2-иламино)-s-тетразинато](ацетилацетонато) никеля (II) (V); 4-тетрапиразинпорфиразина никеля (II) (XI) и 2,9,16,23-тетра(4-гептилфенил) тетрапиразинпорфиразина никеля (II) (XII);

— показано, что процесс электрохимического окисления мочевины или креатинина на модифицированных органическими комплексами толсто пленочных углеродсодержащих электродах (ТУЭ) является каталитическим и лимитируется процессом диффузии аналита к поверхности ТУЭ;

— сопоставлены каталитические и метрологические характеристики ТУЭ, модифицированных наночастицами NiO или комплексами никеля (II). Определено, что на каталитическую активность модификаторов влияют: природа лиганда и растворителя, а также содержание Ni (II) в модифицирующих суспензиях или растворах;

— изучена возможность селективного определения мочевины в реальных образцах с использованием анионообменной колонки и креатинина в модельных растворах с использованием синтезированных ПМО креатинина;

Практическая ценность работы.

Разработанные бесферментные амперометрические сенсоры на основе толсто пленочных электродов, модифицированных соединениями никеля (II), и анионообменной колонки или ПМО креатинина, позволяют ускорить и удешевить определение мочевины и/или креатинина в биологических объектах (сыворотке крови) при диагностике почечной дисфункции по сравнению с используемыми в клинической диагностике методами.

Автор выносит на защиту следующие положения.

❖ Результаты исследования влияния условий синтеза наночастиц NiO на их каталитические свойства в электроокислении мочевины и креатинина

❖ Способы получения сенсоров на основе углеродсодержащих чернил или графитэпоксидной композиции с иммобилизованными органическими комплексами Ni(II). Информацию о факторах, влияющих на вольтамперные характеристики модифицированных толсто пленочных электродов

❖ Результаты исследования электрохимического поведения катализаторов (наночастиц NiO и органических комплексов никеля (II)), иммобилизованных на поверхности толсто пленочных электродов. Информацию о факторах, влияющих на вольтамперные характеристики катализаторов и генерируемый ими аналитический сигнал.

❖ Выбор каталитической системы для электрохимического окисления мочевины и креатинина. Оптимальные условия регистрации максимального каталитического эффекта.

❖ Результаты исследования способности полимеров с молекулярными отпечатками креатинина к специфическому связыванию указанного аналита.

❖ Методики определения мочевины и креатинина на разработанных сенсорах.

Апробация работы.

Результаты исследований представлены на Международном конгрессе по аналитическим наукам ICAS-2006 (Москва, Россия, 2006 г.); на 7 Семинаре «Биосенсоры и биоаналитические μ -технологии в анализе окружающей среды и клинических анализах» (Кашадаси, Турция, 2006 г.); на Всероссийской научной конференции «Природные макроциклические соединения и их синтетические аналоги» (Сыктывкар, Республика Коми, 2007 г.); на Научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве» (Томск, Россия, 2007 г.); на VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «ЭМА-2008» (Уфа, Башкортостан, 2008 г.); на третьей всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО-2009» (Екатеринбург, Россия, 2009 г.); на III Всероссийской конференции с международным участием «Аналитика России» (Краснодар, Россия, 2009 г.)

Публикации. Основное содержание работы представлено в виде 1 статьи в журнале, рекомендованном ВАК, и тезисов 7 докладов на международных и всероссийских конференциях.

Личное участие автора состоит в решении основных задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке, интерпретации и систематизации результатов исследования.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, трех глав результатов и их обсуждения, выводов, списка использованной литературы.

Материал диссертации изложен на 133 страницах, содержит 48 рисунков, 5 схем и 18 таблиц. Список литературы включает 107 наименований работ российских и зарубежных авторов.

Первая глава (литературный обзор) содержит описание методов определения мочевины и креатинина в современной клинической диагностике. Приведены примеры использования электрохимических сенсоров на основе соединений Ni (II) в анализе NH_2 — и OH — содержащих органических веществ. Описаны особенности синтеза и применения в анализе органических соединений полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО). Изложены задачи эксперимента. Во **второй главе** приведены условия проведения эксперимента. В **третьей главе** приводятся результаты исследования влияния условий синтеза наночастиц NiO на их каталитическую активность в электрохимическом окислении мочевины. **Четвертая глава** посвящена разработке амперометрических сенсоров на основе органических комплексов Ni (II). В **пятой главе** приведены результаты селективного определения мочевины в сыворотке крови и креатинина в модельных растворах с использованием анионообменной колонки и ПМО креатинина, соответственно.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

АППАРАТУРА И РЕАКТИВЫ

Вольтамперометрические и хроноамперометрические исследования проводили с использованием инверсионного вольтамперометрического анализатора «ИВА-5» (ООО НПВП «ИВА», Екатеринбург). Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку с рабочим объемом 10 см³. В качестве вспомогательного электрода использовали стеклоуглеродный стержень, электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl/нас. KCl). В качестве индикаторных электродов использовали одноразовые модифицированные толстопленочные электроды на основе углеродсодержащих чернил (ТУЭ) или эпоксидно-графитовой смеси (ТГЭ) (рис.1). ТУЭ и ТГЭ изготовлены методом трафаретной печати (ООО НПВП «ИВА», Екатеринбург).

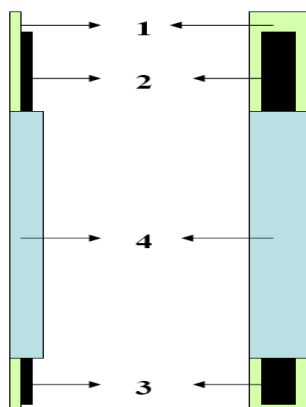


Рис. 1 — Схема толстопленочного электрода:

- 1 — полимерная подложка из стеклотекстолита;
- 2 — токопроводящий слой (углеродсодержащие чернила (ТУЭ) или графит-эпоксидная композиция (ТГЭ));
- 3 — рабочая область;
- 4 — изоляционный слой.

Площадь рабочей зоны составляет 10 мм².

Вид сбоку Вид сверху

В качестве модификаторов использовали наночастицы NiO или органические комплексы никеля (II) (рис. 2): ацетилацетонат никеля (II) (**I**); 1,1,1,7,7,7-гексафторгептан-2,4,6-трикетонат диникеля (II) тетрагидрат (**II**); 4,4,5,5,6,6,7,7,7-нонафтор-1-фенилгептан-1,3-дикетонат никеля (II) (**III**); 4,4,5,5,6,6,6-гептафтор-1-этоксигексан-1,3-дикетонат никеля (II) (**IV**); [(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-(бензотиазол-2-иламино)-s-тетразинато](ацетилацетонато) никеля (II) (**V**); N,N'-бис(этил-2-трифторацетилпропионат-3-ил)этилендиамин никеля (II) (**VI**); N,N'-бис(1,1,2,2-тетрафтор-3-оксо-4-(п-диазатолил)-нонен-4-5-ил)-о-фенилендиамин никеля (II) (**VII**); пятиядерный кластер состава Ni₅(μ₃-OH)₂(μ-OOCC(CH₃)₃)₄(μ-N,N',N''-3,5-Me₂C₃HN₂C₂(O)N₄)₄(CH₃CN)₂ (**VIII**); комплекс 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-ундециламино-1,2,4,5-тетразина с ацетатом никеля (II) состава Ni₃tz₂(OH)(H₂O)₂(CH₃COO)₅, где tz — 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-ундециламино-1,2,4,5-тетразин (**IX**); комплекс 3,6-бис(3,5-диметилпиразол-1-ил)-s-тетразин с кластером Ni₉(HOCCMe₃)₄(μ₄-OH)₃(OOCCMe₃)₁₂ (**X**); 4-тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (**XI**); 2,9,16,23-тетра(4-гептилфенил) тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (**XII**); никелевый комплекс 1-(2-фенил)-2-(мезо-тетрафенилпорфирин-2-ил)-этанона (**XIII**); никелевый комплекс 1-(2-нитрофенил)-2-(мезо-тетрафенилпорфирин-2-ил)-этанона (**XIV**); мезо-тетрафенилпорфиринат никеля (II) (**XV**); октаэтилпорирират никеля (II) (**XVI**). Указанные комплексные соединения синтезированы сотрудниками ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН; чистоту реагентов проверяли методами ИК-, ЯМР-спектроскопии и элементного анализа.

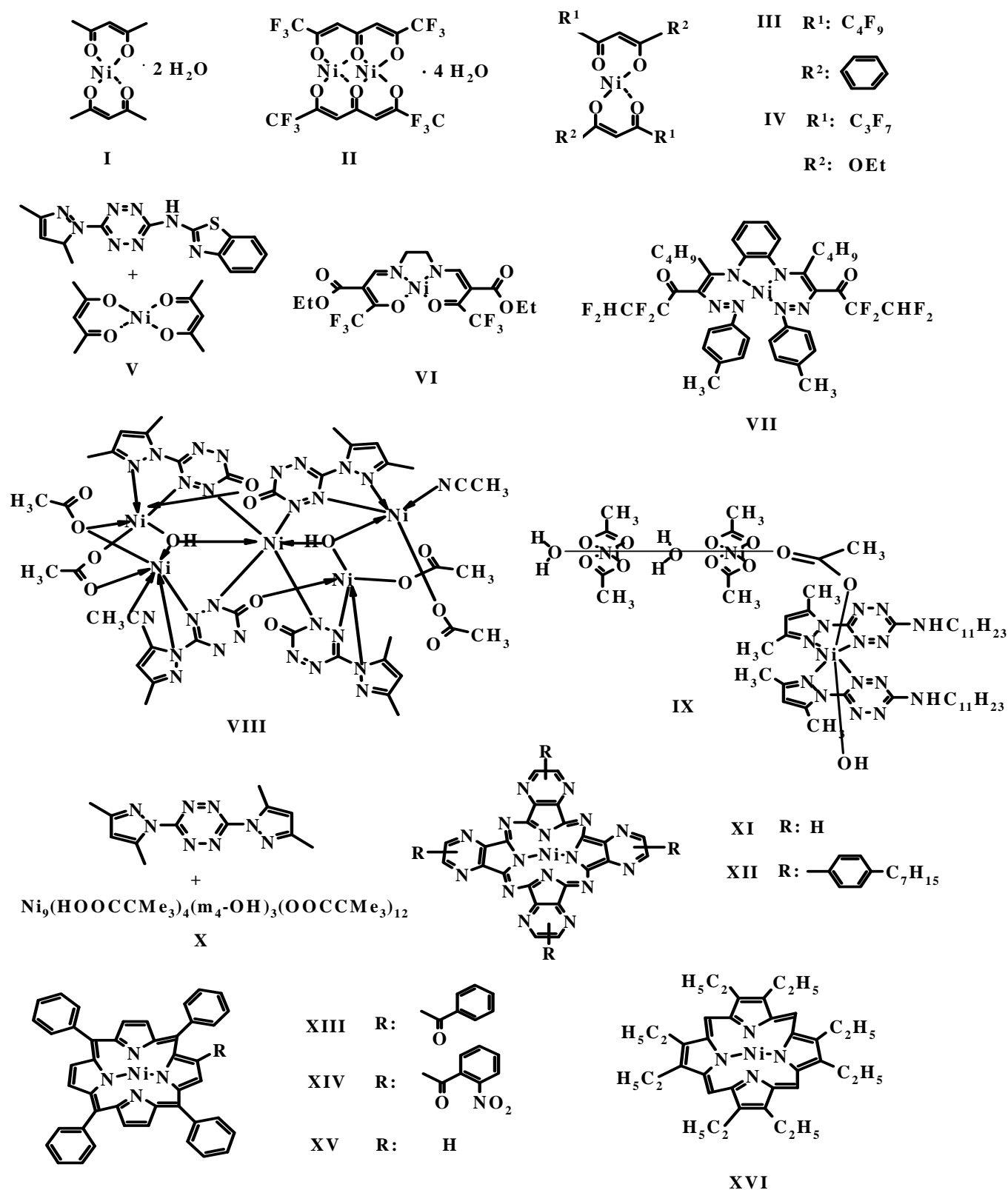


Рис. 2 — Структурные формулы исследуемых комплексов никеля (II)

В качестве объектов исследования использовали мочевины и креатинин (рис. 3). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду и реактивы квалификации ос.ч., х.ч. и ч.д.а.

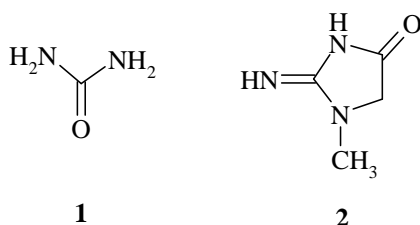


Рис. 3 — Структурные формулы мочевины (1) и креатинина (2).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выбор каталитической системы осуществляли на основании результатов циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. Соответствие найденной концентрации введенной использовали в качестве критерия правильности результата.

Анализ включал две стадии: I стадия — формирование поверхности модифицированного электрода многократным циклированием в интервале потенциалов 0 – 0,7 (0,9) В, на фоне 0,25 М NaOH.; II стадия — хроноамперометрическое определение содержания аналита на фоне 0,25 М NaOH при потенциале, определяемом в зависимости от используемого модификатора. Концентрацию мочевины или креатинина рассчитывали по формуле:

$$C_{обр} = C_{доб} \times \left(\frac{\Delta I_{обр}}{\Delta I_{доб}} \right) \times \frac{V_{доб}}{V_{обр}},$$

где

$\Delta I_{доб}$ – ток окисления модификатора, полученный после введения в раствор стандартной добавки мочевины или креатинина;

$\Delta I_{обр}$ – ток окисления модификатора, полученный в присутствии стандартной добавки мочевины или креатинина (образца);

$C_{доб}$ – концентрация стандартной добавки мочевины или креатинина;

$V_{доб}$ – объем стандартной добавки мочевины или креатинина, вводимый в ячейку;

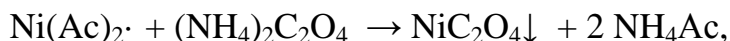
$V_{обр}$ – объем второй стандартной добавки (образца), вводимой в ячейку

1. ИСЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ NiO

1.1 Выбор метода синтеза наночастиц NiO

Основное требование, предъявляемое к методу синтеза, - возможность получения наночастиц с заданными размерами и формой. Этому требованию наиболее соответствует метод обратной микроэмульсии, позволяющий получить наночастицы с узкодисперсным распределением по размерам.

Синтез наночастиц NiO осуществляли в два этапа. На первом этапе синтеза получали прекурсоры — наночастицы оксалата никеля (II) ($\text{NiC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) методом осаждения в присутствии ПАВ: ЦТАБ или АОТ (диоктилсульфосукцината натрия) по схеме:



где Ac — ацетат анион.

На втором этапе синтеза осадок, очищенный от молекул ПАВа, высушивали при 120 °С в течение 1 часа, затем отжигали при 450°С в течение 6 часов до образования темно-серых чешуек, содержащих наночастицы NiO.

При синтезе прекурсора по первому способу, с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ, проводили осаждение наночастиц $\text{NiC}_2\text{O}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ путем добавления по каплям

микроэмульсии **2** к микроэмульсии **1** (Таблица 1) при интенсивном перемешивании. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при $\sim 22^{\circ}\text{C}$, 45°C или 60°C .

Таблица 1

Состав микроэмульсий, используемых для синтеза наночастиц прекурсора

Тип компонента микроэмульсии	Состав микроэмульсии	
	Микроэмульсия 1	Микроэмульсия 2
водная фаза (10,05% вес.)	0,1М $\text{Ni}(\text{Ac})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1М $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
ПАВ (16,76% вес.)	ЦТАБ	ЦТАБ
со-ПАВ (13,90 % вес.)	n-бутанол	n-бутанол
органическая фаза (59,29 % вес.)	октан	октан

При синтезе по второму способу в качестве ПАВ использовали АОТ. К микроэмульсии, содержащей 1,5 г АОТ в 100 мл толуола и 5 мл 0,1М водного раствора ацетата никеля (II) при интенсивном перемешивании по каплям вносили 10 мл 0,1М раствора оксалата аммония. Полученную смесь перемешивали со скоростью 1000 об/мин в течение 1 часа при $\sim 22^{\circ}\text{C}$, 45°C или 60°C .

На конечной стадии в обоих способах полученные продукты, охлаждённые до комнатной температуры, осаждали путем центрифугирования со скоростью 20000 об/мин. Очистку от молекул ЦТАБ проводили смесью хлороформа с этанолом, а от молекул АОТ последовательно деионизированной водой и этанолом, с последующим центрифугированием для полного осаждения продукта.

Для очистки прекурсора от молекул АОТ, также как и от молекул ЦТАБ, достаточно 10-12 циклов смены растворителя и центрифугирования.

1.2 Электронно-микроскопические и энергодисперсионные исследования наночастиц NiO

Размер и форму полученных наночастиц NiO исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Согласно данным ПЭМ, наночастицы NiO имеют сферическую форму, независимо от природы ПАВ. Средний диаметр наночастиц варьируется от 15 нм до 24 нм в зависимости от температурного режима синтеза.

Наночастицы с наиболее узким распределением по размерам и наименьшим средним диаметром, равным 15 нм, были получены при проведении синтеза в присутствии ЦТАБ в качестве ПАВ при $\sim 22^{\circ}\text{C}$. (рис. 4).

Для всех образцов наночастиц NiO были получены одинаковые данные по энергодисперсионному спектральному анализу и химическому составу, подтверждающие природу наночастиц. Согласно полученным данным рентгенофазового анализа, наночастицы NiO имеют ромбоэдрическую кристаллическую структуру с гексагональной сингонией.

Распределение наночастиц NiO на рабочей поверхности электрода исследовали с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ).

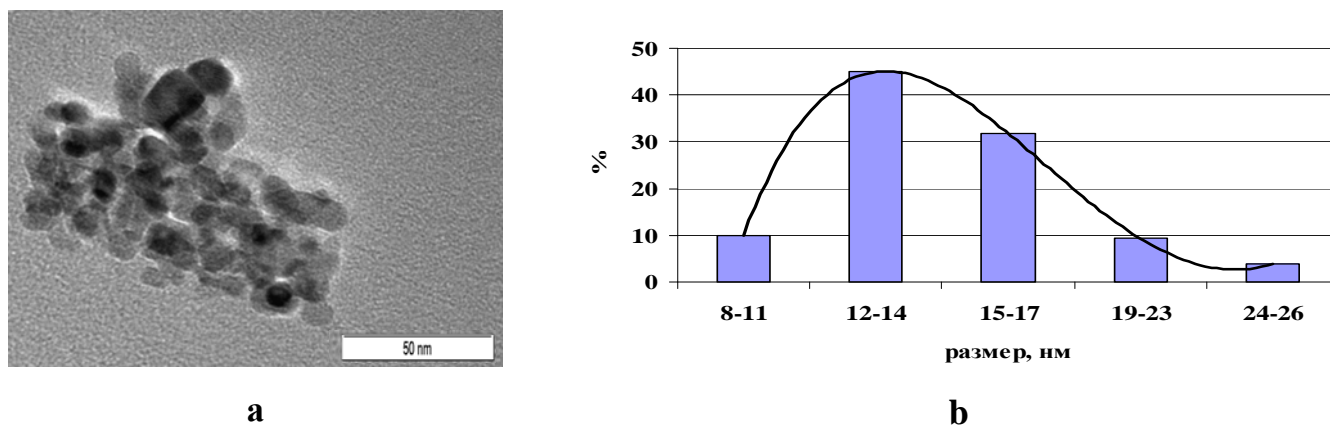


Рис. 4 - Микрофотографии (а) и гистограммы распределения по размерам (б) наночастиц: NiO (синтез прекурсора осуществляли с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ при $\sim 22^{\circ}\text{C}$)

Согласно результатам РЭМ, наночастицы NiO агломерируют на поверхности толсто пленочного электрода, причем, форма агломератов и распределение частиц по размерам зависят от природы ПАВ и от температурного режима синтеза, соответственно. Исключение составляют наночастицы NiO, синтезированные при 45°C с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ. Указанные наночастицы агломерируют на поверхности электрода не в виде стержней, а в виде агломератов неправильной формы с узким распределением по размерам с преобладающей фракцией до 500 нм (рис.5).

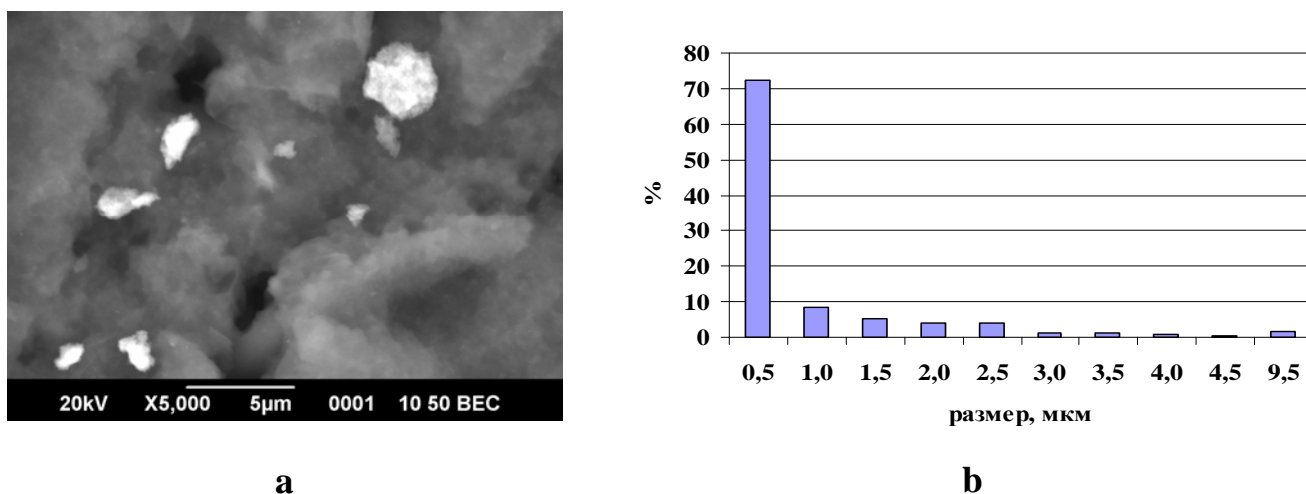


Рис. 4 - РЭМ микрофотографии (а) и гистограммы распределения по размерам агломератов наночастиц (б) на рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных наночастицами NiO (синтез прекурсора осуществляли с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ при 45°C).

1.3 Исследование каталитической активности наночастиц NiO при электрохимическом окислении мочевины

Регистрацию сигнала осуществляли методом, описанным в п. «Методика эксперимента».

На циклических вольтамперограммах, зарегистрированных после формирования рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных наночастицами NiO, наблюдаются характерные для системы Ni (II)/Ni (III) пары анодно-катодных пиков. Однако, только в случае наночастиц NiO, синтезированных при 45°C с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ, величины анодно-катодных пиков на порядок превышают соответствующие

величины зарегистрированные в случае применения остальных образцов наночастиц (рис. 6). Это свидетельствует о формировании на рабочей поверхности ТУЭ значительно большего количества каталитических центров, что вероятно, связано с узким распределением агломератов наночастиц NiO по размерам на рабочей поверхности электрода с преобладающей фракцией до 500 нм.

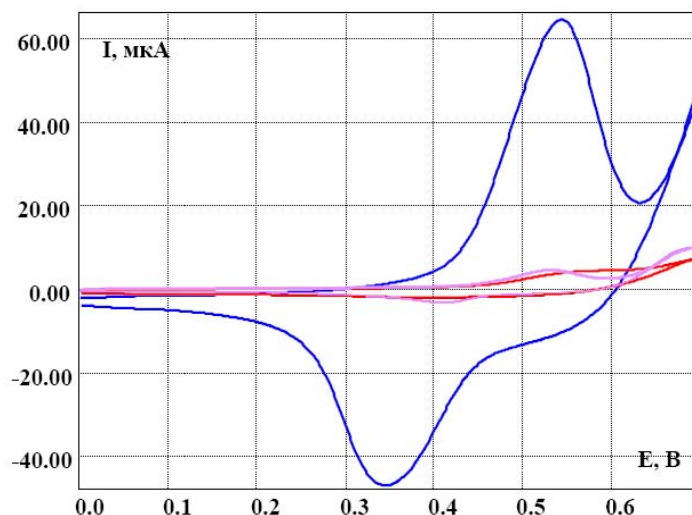


Рис. 6 — Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные после формирования поверхности модифицированных ТУЭ. В качестве модификаторов использовали, наночастицы NiO, синтезированные с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ при:
1 — ~ 22° С; **2** — 45° С; **3** — 60° С.
 Фон 0,25 М NaOH

Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные для ТУЭ, модифицированных наночастицами NiO, синтезированными с использованием АОТ в качестве ПАВ, аналогичны циклическим вольтамперограммам **1** и **3**, представленным на рис. 6.

Кроме того, электрохимический отклик в присутствии 1 мМ мочевины был получен только при использовании ТУЭ, модифицированных наночастицами NiO, синтез которых осуществляли при 45° С с применением ЦТАБ в качестве ПАВ. Поэтому, дальнейшие исследования проводились с использованием в качестве модификаторов этих наночастиц NiO.

Содержание наночастиц NiO варьировали нанесением на рабочую зону электродов по 3 мкл суспензии модификатора, содержащей: 0,06 г/л (ТУЭ - NiO (0,06)), 0,10 г/л (ТУЭ - NiO (0,10)), 0,25 г/л (ТУЭ - NiO (0,25)), 0,5 г/л (ТУЭ - NiO (0,50)) или 1,00 г/л (ТУЭ - NiO (1,00)) наночастиц NiO (расчет на содержание Ni (II) в суспензии).

На рисунке 7 представлена зависимость тока анодного пика от содержания наночастиц в модифицирующей суспензии. Насыщение зависимости наблюдается в случае, когда содержание наночастиц превышает значение 0,50 г/л.

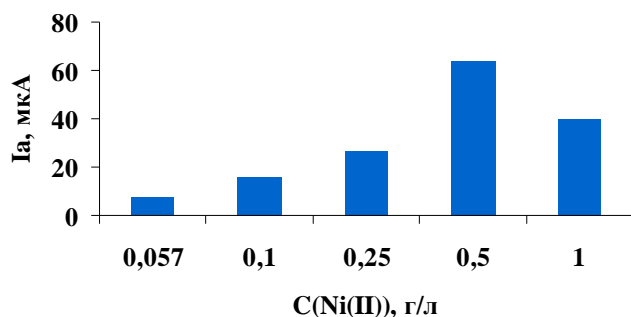


Рис. 7 - Зависимость величины тока анодного пика от содержания наночастиц NiO в модифицирующей суспензии.

Вероятно, это связано с тем, что при увеличении содержания наночастиц ускоряется процесс агломерации (не только на поверхности электрода, но уже в исходном коллоидном растворе), что приводит к более плотной, но не равномерной упаковке на рабочей поверхности электрода. Увеличение величины отношения объем -

поверхность приводит к существенным фазовым изменениям, в результате чего такой модификатор начинает работать как фаза, т.е. из наносостояния происходит переход в макросостояние. Величина аналитического сигнала такого модификатора существенно ниже, чем ансамбля наночастиц.

В ходе исследования каталитической активности ТУЭ – NiO в электрохимическом окислении мочевины были получены линейные зависимости хроноамперометрического сигнала окисления аналита от его концентрации:

$$I = 0,011 \times C + 0,012 \quad (R=0,9847) \text{ в случае ТУЭ – NiO (0,10);}$$

$$I = 0,929 \times C + 1,472 \quad (R= 0,9531) \text{ в случае ТУЭ – NiO (0,50).}$$

В случае ТУЭ – NiO (0,06) не было получено четких хроноамперометрических сигналов, а в случае ТУЭ – NiO (0,25) хроноамперометрические сигналы окисления мочевины в рассматриваемом диапазоне концентраций значительно отклоняются от линейности. Можно предположить, что этого количества наночастиц не хватает для регистрации выраженного электрокаталитического аналитического отклика.

Недостаточная чувствительность модифицированных ТУЭ по сравнению с используемыми методами определения мочевины, а также низкие значения коэффициентов корреляции зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины не позволяют использовать эти электроды для определения мочевины. Вероятно, это связано с тем, что на поверхности наночастиц находится слой углерода, препятствующий образованию каталитически активных оксо-гидрокси частиц Ni (III), а также способности самих наночастиц агломерировать на рабочей поверхности электрода и образовывать макрофазы.

В связи с этим, в качестве электрохимического окисления мочевины и креатинина были исследованы органические комплексы никеля (II), которые, кроме прочего, способны дополнительно координировать молекулы мочевины или креатинина вблизи каталитического центра за счет функциональных групп лиганда.

2. Органические катализаторы электрохимического окисления мочевины и креатинина

2.1 Выбор материала толсто пленочного электрода

Выбор материала электропроводящего слоя и рабочей зоны электрода производили по величине и воспроизводимости величин тока при заданном потенциале зарегистрированных в присутствии мочевины (Таблица 2). В качестве катализаторов были выбраны комплексы **II** и **III**. Выбор этих комплексов продиктован их структурными особенностями. Наличие акцепторных групп (перфторметильные группы) повышает как каталитическую активность Ni(II), так и способность карбонильных групп, связанных с ионами Ni^{2+} , координировать молекулы мочевины. Это позволяет получить четкие и различимые хроноамперометрические сигналы.

Таблица 2

Результаты хроноамперометрического определения мочевины на ТУЭ, модифицированных комплексами **II** или **III**, полученные методом «введено-найдено». Введено 1,00 mM мочевины (n= 5, P=0,95). Фоновый электролит: 0,25 M NaOH

катализатор	электрод	$C_{cp} \pm \delta$, mM	S_r , %	R, %
II	ТУЭ	$1,07 \pm 0,16$	14,4	107
	ТГЭ	$1,12 \pm 0,17$	15,3	112
III	ТУЭ	$1,01 \pm 0,15$	13,0	101
	ТГЭ	$1,08 \pm 0,14$	12,4	108

Результаты, полученные с использованием ТУЭ и ТГЭ равнозначны, поэтому в дальнейших исследованиях применяли толстопленочные электроды на основе углеродсодержащих чернил, технология изготовления которых более проста.

2.2 Выбор способа иммобилизации катализатора

Влияние способа иммобилизации на аналитический отклик каталитической системы в присутствии мочевины было исследовано с использованием комплекса **I**. Выбор комплекса **I** в качестве катализатора электрохимического окисления мочевины обусловлен отсутствием в структуре комплекса функциональных групп, способных к координации с молекулами мочевины, т.о. аналитический отклик в присутствии мочевины и каталитический эффект обусловлены только системой Ni (II)/Ni (III).

1 способ (объемное модифицирование): 20 мкл раствора ацетилацетоната никеля (II) в CHCl_3 ($\text{C}(\text{Ni}(\text{II}))=1,67$ г/л) тщательно перемешивали с 0,2 г чернил «Metech». Концентрации исходных растворов подбирались таким образом, чтобы содержание Ni (II) в смеси составляло 10%, 20%, 30% или 40%. Полученную смесь наносили через маску на рабочую поверхность электрода. Сушили при 70°C в течение часа. Электроды использовали в работе через сутки.

2 способ (метод капельного нанесения): 3 мкл раствора ацетилацетоната никеля (II) в ДМФА ($\text{C}(\text{Ni}(\text{II}))=5,85$ г/л) или в CH_3CN ($\text{C}(\text{Ni}(\text{II}))=2,50$ г/л) наносили на рабочую зону ТУЭ. Сушили при комнатной температуре до полного испарения растворителя. Электроды использовали в работе через сутки.

Каталитическая активность комплекса **I**, внесенного в объем (*1 способ*) или нанесенного на поверхность (*2 способ*) ТУЭ, определялась по величине и воспроизводимости амперометрического сигнала в присутствии мочевины с заданной концентрацией. Больший по величине и более воспроизводимый амперометрический сигнал был получен для ТУЭ, модифицированных по методу капельного нанесения с использованием ДМФА в качестве растворителя.

Наиболее правильные результаты определения мочевины с использованием метода «введено-найденно» были получены при использовании ТУЭ, модифицированных по методу капельного нанесения с использованием ДМФА в качестве растворителя (табл. 3). В случае объемного модифицирования ТУЭ полученные результаты практически не зависят от содержания Ni(II) в объеме чернил. При содержании Ni(II) в объеме чернил от 10 до 40% и введенной добавке мочевины, равной 1,00 мМ, было найдено $0,77 \pm 0,13$ мМ мочевины ($S_r = 22,9\%$, $R = 77\%$, $n = 7$, $P = 0,95$).

Таблица 3

Проверка правильности определения мочевины при использовании модифицированных методом капельного нанесения ТУЭ методом «введено-найденно». (Введено: 1 мМ мочевины; $n = 7$; $P = 0,95$).

С(Ni (II)) в модифицирующем растворе, г/л (растворитель)	Найдено: $C_{cp} \pm \delta$, мМ	$S_r, \%$	$R, \%$
5,85 (ДМФА)	$0,98 \pm 0,07$	9,5	98
2,50 (CH_3CN)	$0,89 \pm 0,15$	24,8	89

Таким образом, для модифицирования ТУЭ оптимальным является метод капельного нанесения. Следует отметить, что на правильность определения мочевины влияет не только метод модифицирования электрода, но и природа растворителя используемого для получения модифицирующего раствора.

В случае остальных комплексов никеля (II) модифицирование ТУЭ проводили по 2 способу с использованием растворов или суспензий комплексов никеля (II) в разных растворителях. Суспензии использовались только в тех случаях, когда из-за низкой растворимости комплекса в большинстве растворителей не удавалось получить растворов соответствующих модификаторов.

2.3 Выбор каталитической системы для электрохимического окисления мочевины и/или креатинина

Первичный отбор катализатора был осуществлен на основании величин анодно-катодного пиков и ΔE , полученных с использованием циклической вольтамперометрии. Влияние природы органического лиганда и условий иммобилизации на электрохимические характеристики модифицированных ТУЭ были исследованы методом циклической вольтамперометрии. Дальнейшие хроноамперометрические исследования подтверждают правильность выбора того или иного катализатора. Каталитическая активность иммобилизованных органических комплексов никеля (II) исследовалась на примере электрохимического окисления мочевины. Каталитическую активность выбранных на основании вольтамперных характеристик (наибольшие величины анодно-катодного пиков, близкие к 57 мВ значения ΔE (обратимость системы Ni (II)/Ni (III))) органических комплексов никеля (II) определяли по соотношению $I_{\text{кат}}/I_{\text{NiL}}$, где $I_{\text{кат}}$ — каталитический ток окисления мочевины, регистрируемые в хроноамперометрическом режиме, I_{NiL} — ток окисления комплекса никеля (II).

В табл. 4 и 5 приведены, соответственно, результаты оценки каталитической активности и правильности определения мочевины полученные с использованием ТУЭ, модифицированных растворами или суспензиями органических комплексов никеля (II), структурные формулы которых приведены на рис. 2.

Таблица 4

Оценка каталитической активности ТУЭ, модифицированных выбранными комплексами никеля (II) в присутствии 1 мМ мочевины. (n= 5; P=0,95)

Растворитель	$C_{\text{Ni (II)}}$, г/л	$E_{\text{ох}} \pm \delta$, мВ; (S_r , %)	$E_{\text{изм}} \pm \delta$, мВ; (S_r , %)	$I_{\text{кат}}/I_{\text{NiL}} \pm \delta$; (S_r , %)
ТУЭ-II				
ДМСО	8,56 ⁽¹⁾	0,51±0,05; (10,7)	0,55±0,05; (9,4)	1,81±0,18; (11,3)
ТУЭ-III				
ДМФА	14,88 ⁽¹⁾	0,52±0,01; (4,4)	0,56±0,01; (5,9)	1,78±0,21; (13,2)
ТУЭ-V				
ДМФА	2,93 ⁽²⁾	0,53±0,01 (7,3)	0,55±0,01 (8,1)	3,96±0,48 (13,8)
ТУЭ-XI				
ДМФА	2,02 ⁽²⁾	0,63±0,04; (3,7)	0,67±0,04; (3,0)	2,04±0,27; (14,9)
ТУЭ-XII				
ДМФА	0,81 ⁽²⁾	0,51±0,02; (5,4)	0,54±0,02; (7,3)	3,66±0,36; (18,4)

1 — раствор модификатора; 2 — суспензия модификатора

Таблица 5

Проверка правильности определения мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных выбранными комплексами никеля (II) методом «введено-найдено». (Введено 1 мМ мочевины; $n = 5$; $P = 0,95$).

Растворитель	$C_{Ni(II)}$, г/л	Найдено: $C_{м\pm\delta}$, мМ	S_r , %	R , %
ТУЭ-II				
ДМСО	8,56 ⁽¹⁾	0,97±0,08	9,7	97
ТУЭ-III				
ДМФА	14,88 ⁽¹⁾	0,97±0,07	7,9	97
ТУЭ-V				
ДМФА	2,93 ⁽²⁾	1,00±0,01	1,7	100
ТУЭ-XI				
ДМФА	2,02 ⁽²⁾	1,03±0,02	9,6	103
ТУЭ-XII				
ДМФА	0,81 ⁽²⁾	0,91±0,08	11,1	91

1 — раствор модификатора; 2 — суспензия модификатора

Таким образом, среди изученных 16-ти потенциальных каталитических систем электрохимического окисления карбонилсодержащих аминов, наиболее перспективными оказались только 5 органических комплексов Ni (II): **II**, **III**, **V**, **XI** и **XII**.

2.4 Кинетика каталитического электрохимического окисления мочевины и креатинина

На рис. 8 и 9 приведены циклические вольтамперограммы зарегистрированные с использованием немодифицированного ТУЭ и ТУЭ, модифицированного комплексом **III** в отсутствии и в присутствии мочевины или креатинина соответственно.

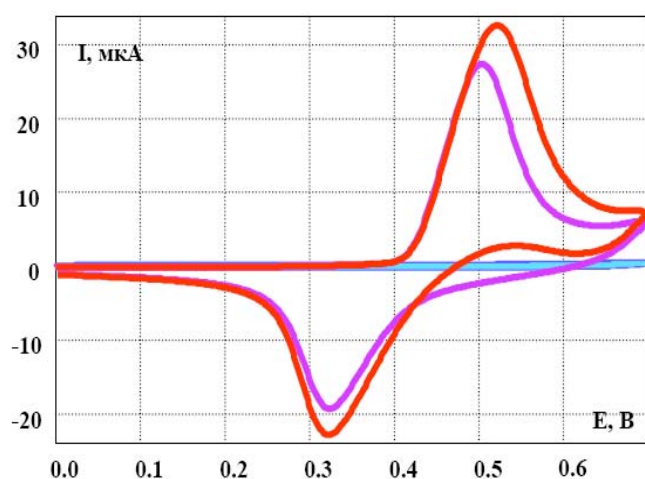


Рис. 8 — Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на немодифицированном ТУЭ:

1 - в отсутствие мочевины в растворе,
2 - в присутствии 3 мМ мочевины в растворе,
и на ТУЭ-III:

3 - в отсутствие мочевины в растворе,
4 - в присутствии 3 мМ мочевины в растворе.

Фон: 0,25М NaOH. Скорость развертки потенциала 0,1 В/с

Отклик тока окисления мочевины или креатинина наблюдается только при использовании модифицированных комплексами ТУЭ, в частности, ТУЭ-III, что свидетельствует об электрокаталитическом окислении соответствующих аналитов.

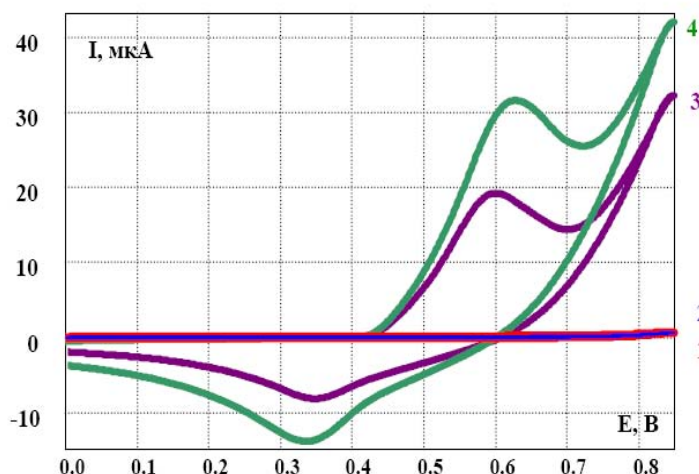
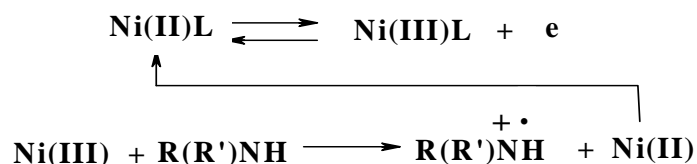


Рис. 9 — Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на немодифицированном ТУЭ:

1 - в отсутствие креатинина в растворе,
2 - в присутствии 0,02 мМ креатинина в растворе,
 и на ТУЭ-III:
3 - в отсутствие креатинина в растворе,
4 - в присутствии 0,02 мМ креатинина в растворе.

Фон: 0,25М NaOH. Скорость развертки потенциала 0,1 В/с

Принимая во внимание, что соединения, содержащие аминогруппу, в процессе электрохимического окисления образуют катион-радикалы[†], процесс электрохимического каталитического окисления мочевины или креатинина можно представить следующей схемой:



где R(R')NH_2 — мочевина или креатинин, L — органический лиганд.

Кинетику электрохимического окисления мочевины и креатинина исследовали с использованием ТУЭ, модифицированных комплексом **III** в ДМФА

Изучена зависимость величины тока окисления катализатора (I, мкА) от скорости наложения потенциала (v, мВ/с) методом циклической вольтамперометрии на фоне 0,25 М NaOH. Линейная зависимость: $I = 0,04 \times v + 0,25$; $R = 0,9997$, указывает на то, что в электрохимическом процессе принимает участие электроактивное вещество, локализованное на поверхности ТУЭ. По всей видимости, этот процесс представляет собой процесс обратимого электрохимического окисления Ni(II)L/Ni(III)L .

Зависимость тока окисления мочевины (I, мкА) от обратного квадратного корня времени регистрации аналитического сигнала ($t^{-0.5}$, $\text{с}^{-0.5}$) в присутствии 1 мМ мочевины получена методом хроноамперометрии. Линейная зависимость в диапазоне времени регистрации аналитического сигнала от 30 до 70 секунд ($I = 0,65 \times t^{-0.5} + 0,25$; $R = 0,9971$) подчиняется уравнению Коттрела. Это указывает на то, что процесс окисления мочевины лимитируется диффузией аналита из объема раствора. При исследовании процесса электрохимического окисления креатинина также получена линейная зависимость I от $t^{-0.5}$.

Таким образом, можно предположить, что скорость процесса окисления исследуемых аминов лимитируется диффузией аналита к рабочей поверхности ТУЭ

[†] Осетрова Н.В. Анодное окисление мочевины в нейтральных растворах /Н.В.Осетрова, А.М. Скундин //Электрохимия — 1994. Т. 30 № 10. — с. 1257-1259

2.5 Определение мочевины и креатинина с использованием модифицированных толстопленочных углеродсодержащих электродов

В таблице 6 приведены аналитические характеристики определения мочевины и креатинина с использованием ТУЭ, модифицированных комплексами **II**, **III**, **V**, **XI** и **XII**.

Таблица 6

Проверка правильности и аналитические характеристики хроноамперометрического определения мочевины и креатинина с использованием ТУЭ, модифицированных выбранными органическими комплексами Ni (II). Фон: 0,25 М NaOH. (n =5, P= 0,95).

электрод	С _{амина} , мМ		S _r , %	R, %	Уравнение регрессии, (I _{cat} : μA; C: мМ)	r	Диапазон концентраций, мМ
	Введено	Найдено					
Мочевина							
ТУЭ-II	1	1,11±0,09	9,4	111	I= 5,46×C + 9,08	0,9951	0,01÷10,00
ТУЭ-III		1,09±0,09	8,5	109	I= 0,26×C +0,55	0,9991	
ТУЭ-V		0,98±0,05	5,5	98	I= 18,71×C + 20,62	0,9923	
ТУЭ-XI		0,85±0,12	6,7	85	I= 5,73×C +9,57	0,9987	
ТУЭ-XII		0,95±0,08	7.0	95	I= 0,04×C +0,65	0,9947	
Креатинин							
ТУЭ-II	0,5	0,54±0,09	13,6	108	I= 1,88×C + 0,38	0,9974	0,03 ÷ 0,50
					I=1,45×C + 0,79	0,9877	0,03 ÷ 1,00
ТУЭ-III		0,58±0,20	27,7	116	I= 0,92×C + 0,12	0,9987	0,05 ÷ 0,55
					I= 0,72×C - 0,04	0,9544	0,03 ÷ 1,00
ТУЭ-V		0,46±0,04	7,8	92	I= 2,11×C + 0,18	0,9972	0,03 ÷ 0,50

r — коэффициент корреляции

ТУЭ, модифицированные комплексом **XII** генерируют наименее выраженные (из представленной группы катализаторов) аналитические сигналы окисления мочевины в диапазоне исследуемых концентраций аналита. Вероятно, это связано с частичным экранированием гептилфенильными заместителями Ni²⁺ — центров катализатора от молекул мочевины.

Максимально близкие и воспроизводимые значения найденной добавки были получены при использовании ТУЭ, модифицированных комплексами **II**, **III**, **V** и **XI**.

Диапазон линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины в случае указанных модифицированных ТУЭ составляет от 1,0×10⁻⁵ до 1,0×10⁻² М. Предел обнаружения мочевины, равный 8,7·10⁻⁶ М (по 3σ-критерию), ниже предела обнаружения мочевины в сыворотке крови (C_{min} = 2,0×10⁻⁴ М), полученного при использовании стандартного ферментативного метода с применением колориметрического анализатора BUN/UREA Vitrous System (Johnson & Johnson, Великобритания).

При проведении электрохимического определения креатинина использовали ТУЭ, модифицированные комплексами **II**, **III**, **V**, **XI** и **XII**. Известно, что каталитическая активность соединений никеля (II) в реакции электрохимического окисления уменьшается при переходе от первичного к вторичному амину. Так как креатинин содержит иминогруппу, логично ожидать уменьшения электрокаталитического отклика

окисления креатинина для используемых модифицированных ТУЭ в сравнении с электрокаталитическим откликом при окислении мочевины. Действительно, в случае применения модифицированных ТУЭ, на основе **XI** и **XII**, не были получены хорошо выраженные сигналы окисления креатинина.

Однако, в случае применения ТУЭ, модифицированных комплексами **II**, **III** и **V** в электрохимическом каталитическом окислении креатинина аналитический сигнал оказался достаточно выраженным, для осуществления определения креатинина (табл. 6). При использовании указанных модифицированных ТУЭ были получены оптимальные результаты (максимально близкие и воспроизводимые значения найденной добавки). Диапазон линейности аналитического сигнала от концентрации креатинина составляет $5,0 \times 10^{-5}$ до $1,0 \times 10^{-3}$ М. Предел обнаружения равный $2,7 \times 10^{-5}$ М, ниже минимального содержания креатинина в сыворотке крови взрослого здорового человека ($4,4 \times 10^{-5}$ М).

Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации креатинина с коэффициентом корреляции 0,999, а также низкий предел обнаружения подтверждают возможность использования метода добавок для расчета концентрации креатинина в реальных объектах.

3. Селективное определение мочевины и/или креатинина с использованием полимеров с молекулярными отпечатками.

Определение мочевины в модельных растворах, имитирующих сыворотку крови.

Для селективного выделения и концентрирования мочевины из модельного раствора использовали анионообменную колонку «HYPERSEP IC-OH» (производства «Metrohm», Швейцария). В качестве модельных использовали водные растворы следующих веществ:

1) Mr1 — аланин ($3,14 \cdot 10^{-4}$ М), глицин ($3,20 \cdot 10^{-4}$ М), лейцин ($1,87 \cdot 10^{-4}$ М), аспарагиновая кислота ($0,22 \cdot 10^{-4}$ М), глутаминовая кислота ($0,89 \cdot 10^{-4}$ М), глюкоза ($6,40 \cdot 10^{-3}$ М), аскорбиновая кислота ($0,57 \cdot 10^{-4}$ М), мочева кислота ($4,8 \cdot 10^{-4}$ М), креатинин ($1,00 \cdot 10^{-3}$ М);

2) Mr2, состав которого отличается от состава Mr1 содержанием мочевины, равным $5,00 \cdot 10^{-3}$ М. Концентрации остальных веществ в Mr1 и Mr2 одинаковы.

Предварительно проводили регенерацию анионообменной колонки последовательным пропусканием через колонку 10 мл 10%-го раствора NaOH и 10 мл деионизированной воды. Затем, через колонку пропускали 2 мл модельного раствора Mr1 или Mr2 и проводили определение содержания мочевины в полученном фильтрате по описанной методике эксперимента. В качестве рабочих электродов использовали ТУЭ—**III**.

Содержание мочевины в фильтрате после разделения компонентов модельных растворов Mr1 или Mr2 на анионообменной колонке составило ($n=5$; $P=0,95$): $(0,92 \pm 0,04) \times 10^{-3}$ М; $S_r=5,2\%$ и $(5,37 \pm 0,45) \times 10^{-3}$ М; $S_r=9,6\%$ соответственно.

Согласно полученным результатам использование анионообменной колонки значительно повышает селективность определения мочевины в модельных растворах имитирующих сыворотку крови. Таким образом, описанная методика является перспективной для хроноамперометрического определения мочевины в реальных объектах с использованием ТУЭ, модифицированных органическими комплексами никеля(II).

Определение мочевины в сыворотке крови.

Определение мочевины в реальном объекте (сыворотке крови) проводили с предварительной регенерацией анионообменной колонки как описано выше для модельного раствора. Затем 0,1 мл сыворотки крови разбавляли 0,9 мл 0,9% раствора NaCl. Полученный раствор пропускали через анионообменную колонку и проводили хроноамперометрическое определение мочевины в фильтрате. В качестве рабочих электродов использовали ТУЭ—III.

Таблица 7

Сравнительные результаты определения мочевины в сыворотке крови, полученные с использованием разработанного сенсора ($n=5$; $P=0,95$) и независимого метода*

№	Найдено, мМ		C_2/C_1 , %
	Метод с применением уреазы* (C_1)	ТУЭ-III (C_2)	
1	$13,3 \pm 0,2$	$12,4 \pm 0,7$	93
2	$4,8 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,6$	109
3	$2,30 \pm 0,04$	$2,3 \pm 0,3$	99
4	$4,0 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,2$	100

* — стандартный уреазный метод (Vitros BUN/UREA Slide, Johnson&Johnson Clinical Diagnostics, Inc.).

Результаты исследования сыворотки крови, полученные с применением предлагаемого сенсора (таб.7), удовлетворительно согласуются с результатами, полученными с использованием стандартного уреазного метода.

Определение креатинина в модельных растворах, имитирующих сыворотку крови.

С целью селективного определения креатинина в модельных растворах, исследовали синтезированные в Институте органического синтеза УрО РАН 3 образца ПМО креатинина:

- 1) на основе эпоксидной смолы (П1);
- 2) на основе сшитой дивинилбензолом акриловой кислоты (П2, П3).

В случае П1 наблюдалось набухание в воде и частичное растворение в этаноле. В случае П2 и П3 подобное не наблюдалось, поэтому эти полимеры были выбраны для дальнейших исследований. Отличие полимеров П2 и П3 друг от друга заключается в мольном соотношении акриловая кислота:креатинин в предполимеризационном комплексе, которое для П2 составляет 4:1, а для П3 – 8:1.

Подготовка ПМО. Каждый полимер измельчили, и с помощью лабораторных сит выделили фракцию с диаметром частиц от 40 до 80 мкм. Полученный порошок трижды промыли в ацетоне с последующим фильтрованием под вакуумом для удаления не прореагировавших мономеров;

Вымывание креатинина из структуры полимера провели при перемешивании образцов П2 или П3 в смеси уксусная кислота/деионизированная вода (7/3 по объему), с последующим промыванием деионизированной водой, несколько раз меняя растворитель и фильтруя смесь под вакуумом. После сушки полимеров при 100°C и последующего охлаждения образцы использовали в дальнейших исследованиях.

Регистрацию сигнала осуществляли методом хроноамперометрии с предварительным циклированием потенциалов в интервале 0,0 — 0,8 В по методике,

приведенной в п. «методика эксперимента». В качестве рабочих электродов использовали ТУЭ-III

Определение сорбционной способности полимера относительно креатинина

Эксперимент проводили следующим образом. В стакан вместимостью 25 мл помещали полимер П2 или П3. Затем добавляли 10 мл раствора креатинина с концентрацией 0,10 М и перемешивали в течение 1 часа. Смесь отфильтровали, полученный фильтрат анализировали на наличие креатинина электрохимическим методом по разработанной методике. Содержание креатинина в фильтрате составило $(0,25 \pm 0,07) \times 10^{-1}$ М, $S_r = 20,6\%$; $n=3$ в случае П2 и $(0,26 \pm 0,07) \times 10^{-1}$ М, $S_r = 18,4\%$; $n=3$ в случае П3. Полимер промывали 10 мл этанола и сушили при 80°C до полного испарения этанола.

После сушки полимер помещали в стаканчик вместимостью 25 мл, добавляли 10 мл деионизированной воды и выдерживали 1 час при интенсивном перемешивании смеси. После фильтрования смеси на воронке Шотта проводили хроноамперометрическое определение креатинина в фильтрате по разработанной методике. Содержание креатинина в полученном фильтрате составило $(0,76 \pm 0,12) \times 10^{-1}$ М, $S_r = 21,2\%$; $n=3$ в случае П2 и $(0,82 \pm 0,12) \times 10^{-1}$ М, $S_r = 18,9\%$; $n=3$ в случае П3.

Полученные результаты показывают, что выбранные ПМО сорбируют 70-80 % креатинина.

Определение сорбционной способности полимера относительно креатинина в модельных растворах, имитирующих сыворотку крови

Для определения влияния основных компонентов сыворотки крови человека на селективность П2 и П3 использовали модельные растворы Мр1 и Мр2.

Определение селективности и сорбционной способности полимеров относительно креатинина в модельных растворах проводили по следующей методике. Полимер (П2 или П3) помещали в стаканчик с мешалкой, вносили 2 мл модельного раствора и перемешивали 30 мин. Затем смесь фильтровали под вакуумом, промывали 1 мл деионизированной воды и сушили при 75°C в течении 20 мин. Полимер переносили в стаканчик с мешалкой, вносили 2 мл деионизированной воды, после перемешивания в течении 30 мин, отфильтровали на воронке Шотта. Фильтрат исследовали на содержание креатинина по методике, приведенной в п. «методика эксперимента». При использовании образца П2 найдено ($n = 5$; $P = 0,95$): $1,45 \pm 0,28$ мМ креатинина ($S_r = 17,2\%$) и $1,53 \pm 0,35$ мМ креатинина ($S_r = 19,9\%$) при определении креатинина в Мр1 и Мр2 соответственно. При использовании образца П3 найдено ($n = 5$; $P = 0,95$): $1,43 \pm 0,30$ мМ креатинина ($S_r = 18,6\%$) и $1,55 \pm 0,34$ мМ креатинина ($S_r = 19,2\%$) при определении креатинина в Мр1 и Мр2 соответственно.

Таким образом, полимеры П2 и П3 достаточно селективны относительно соединений, имеющих молекулы больших по сравнению с молекулами креатинина размеров.

Кроме того, для выделения креатинина из модельных растворов могут быть также применены колонки заполненные ПМО креатинина. Схема проведения анализа на содержание креатинина методом хроноамперометрии представлена на рис. 10.

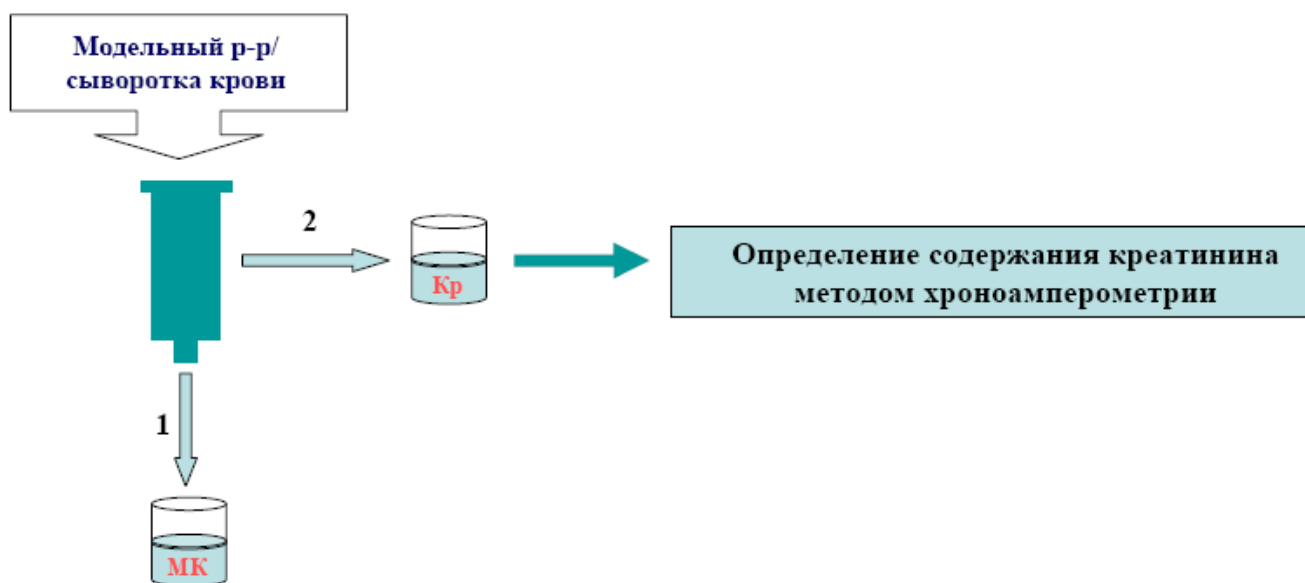


Рис. 10 — Схема проведения анализа на содержание креатинина методом хроноамперометрии. 1 — Сорбция креатинина (Кр) и удаление мешающего компонента (МК) с помощью сорбционной колонки с ПМО. 2 — Десорбция креатинина (Кр) деионизированной водой.

Раствор исследуемого образца подаётся в сорбционную колонку, заполненную ПМО креатинина. В колонке происходит сорбция креатинина. Мешающие компоненты удаляются быстрой промывкой ПМО. Затем проводится выделение креатинина из структуры ПМО деионизированной водой и хроноамперометрическое определение этого карбонилсодержащего амина в фильтрате с использованием модифицированного ТУЭ по алгоритму, описанному в п. «методика эксперимента».

ВЫВОДЫ

1. Методом обратных микроэмульсий синтезированы наночастицы NiO сферической формы, средний диаметр которых составляет порядка 20 нм. Лучшие вольтамперные характеристики и наиболее выраженная электрокаталитическая активность в электрохимическом окислении мочевины наблюдается при использовании образца наночастиц NiO, синтезированных при 45°C с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ. Получена линейная корреляция хроноамперометрического сигнала с концентрацией мочевины ($R=0,9847$, $I = 0,011 \times C + 0,012$; в случае ТУЭ-NiO(0,10) и $R= 0,9531$, $I = 0,929 \times C + 1,472$; в случае ТУЭ-NiO(0,50)) .

2. Сравнение ТУЭ и ТГЭ показало, что наилучшие результаты определения мочевины наблюдаются при использовании ТУЭ, на поверхность которого капельным способом нанесен органический комплекс Ni (II).

3. Выбраны оптимальные синтетические органические катализаторы на основе фторированных ди- и трикетонов, а также макрогетероциклических систем, модифицированных азагетероциклами: 1,1,1,7,7,7-гексафторгептан-2,4,6-трикетонат никеля (II) (II) тетрагидрат (II); 4,4,5,5,6,6,7,7,7-нонафтор-1-фенилгептан-1,3-дикетонат никеля (II) (III); [(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-(бензотиазол-2-иламино)-s-тетразин-то](ацетилацетонато) никель (II) (V); 4-тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (XI) и 2,9,16,23-тетра(4-гептилфенил) тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (XII). Найдена оптимальная концентрация никеля (II) на поверхности толстопленочного электрода для

выбранных катализаторов (в пересчете на содержание Ni (II)): 8,56 г/л (ДМСО) в случае комплекса **II**; 14,88 г/л (ДМФА) в случае комплекса **III**; 2,93 г/л (ДМФА) в случае комплекса **V**, 2,02 г/л в случае комплекса **XI** и 0,81 г/л (ДМФА) в случае комплекса **XII**,

4. Электрокаталитическое окисление мочевины и креатинина происходит через стадию образования каталитически активных оксо-гидроксо-частиц Ni (III), которые являются сильными окислителями. Лимитирующей стадией электрокаталитического окисления указанных аминов является диффузия аналита к рабочей поверхности модифицированного ТУЭ.

5. ТУЭ, модифицированные выбранными органическими комплексами Ni (II), использованы для хроноамперометрического определения мочевины и креатинина. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации аналита наблюдается в широком интервале концентраций: от 1×10^{-2} до 1×10^{-5} М для мочевины и от 1×10^{-3} до 3×10^{-5} М для креатинина. В случае модифицированных ТУЭ получены точные и воспроизводимые результаты, а также низкий предел обнаружения ($8,7 \times 10^{-6}$ М для мочевины и $2,7 \times 10^{-5}$ М для креатинина)

6. Разработан способ применения ПМО креатинина, позволяющий выделить не менее 70% креатинина из модельных растворов в режиме твердофазной экстракции.

7. Разработаны и успешно использованы бесферментные амперометрические сенсоры и методики определения мочевины в сыворотке крови и креатинина в модельных растворах, основанные на электрокаталитическом окислении соответствующих аналитов. Разработанные сенсоры не требуют особых условий хранения, обеспечивают устойчивость сигнала в течение длительного времени, просты и доступны в использовании. Хорошие аналитические и метрологические характеристики ТУЭ, модифицированных органическими комплексами Ni (II), позволяют применять указанные сенсоры и методики вместо используемых в клинической диагностике ферментативных методов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ:

1. Козицина А.Н. Каталитические системы на основе органических комплексов никеля (II) в хроноамперометрическом определении мочевины и креатинина. /А.Н. Козицина, Ж.В. Шалыгина, С.С. Деденева, Г.Л. Русинов, С.Г. Толщина, Е.В. Вербицкий, Х.З. Брайнина //Изв.АН, Сер.хим. — 2009. — № 6. — С. 1091-1097

2. Kozitsina A.N. Electrochemical sensor based on metal-containing receptors for urea measurements /A.N. Kozitsina, Zh.V. Shalygina, S.S. Dedeneva, A.Z. Brainina, O.N. Chupakhin, V.N. Charushin, G.L. Rusinov, R.I. Ishmetova, E.V. Verbitsky, N.K. Ignatenko, S.G. Tolshchina, O.V. Fedorova //International congress on analytical sciences ICAS-2006. Moscow, Russia, 2006. — book of abstracts, v. 1 — P. 291

3. Kozitsina A. Selection of catalytic systems for biomimetic sensors /A. Kozitsina, S. Dedeneva, Kh. Brainina, V. Charushin, O. Chupakhin, G. Rusinov // The 7th Workshop on biosensors and bioanalytical μ -techniques in environmental and clinical analysis. Kaşadası, Türkiye, 2006. — Abstract Book — P. 115

4. Вербицкий Е.В. Синтез производных мезо-тетрафенилпорфирина никеля (II) и исследование их взаимодействия с мочевиной. /Е.В.Вербицкий, М.С. Валова, О.В. Корякова, А.З. Брайнина, А.Н. Козицина, Ж.В. Шалыгина, С.С. Деденева, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, Г.Л. Русинов //Всеросс. научн. конф. «Природные макроциклические соединения и их синтетические аналоги». Сыктывкар, 2007. — Тез. докл. — с. 33-34

5. Глазырина Ю.А. Применение нанотехнологий в разработке био- и химических сенсоров. /Ю.А. Глазырина, Л.В. Устинов, С.С. Деденева, А.Н. Козицина, А.З. Брайнина //Научн.-практич. конф. «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве». Томск, 2007. — Тез. докл. — с. 48-49

6. Козицина А.Н., Шалыгина Ж.В., Деденева С.С., Брайнина Х.З. Комплексы никеля (II) - катализаторы в амперометрическом определении креатинина //VII Всеросс.. конф. по электрохим. методам анализа с междун. участием «ЭМА-2008». Уфа-Абзаково, 2008. — Тез. докл. — с. 53

7. Козицина А.Н. Применение наночастиц NiO в хроноамперометрическом определении креатинина. /А.Н. Козицина, С.С. Деденева, Ю.А. Квашнин, Г.Л. Русинов, В.Н. Чарушин, Х.З. Брайнина //Третья Всеросс. конф. по наноматериалам «НАНО-2009». Екатеринбург, 2009 — Тез. докл. — с. 830-831

8. Деденева С.С. Хроноамперометрическое определение креатинина с использованием наночастиц NiO как катализаторов. /С.С. Деденева, А.Н. Козицина, Ю.А. Квашнин, Г.Л. Русинов, В.Н. Чарушин, Х.З. Брайнина //III Всероссийская конференция с междун. участием «Аналитика России». Краснодар, 2009. — Тез. докл. — С. 388.